

**LANTANIDA(III)-DIETILÉNTRIAMIN-PENTAACETÁT SZÁRMAZÉKOKKAL  
KÉPZŐDŐ KOMPLEXEK LIGANDUMCSERE REAKCIÓINAK KINETIKÁJA: A  
NEMKOVALENS KÖLCÖNHATÁSOK SZEREPE**

A pályázat keretében tervezett tudományos munka szorosan kapcsolódik a kutatócsoportunkban már hosszú ideje folyó, a ritkaföldfémek (lantanidák, La, Y, és Sc) nyíltláncú és makrociklusos aminopolikarboxilát és aminoszfónát ligandumokkal képzett komplexei vizsgálatához. Az említett komplexek közül többet elterjedten alkalmaznak az orvosi diagnosztikában ( $Gd^{3+}$  alapú MRI kontrasztanyagok) ritkábban a terápiában ( $^{90}Y$ ,  $^{153}Sm$ ,  $^{166}Ho$  és  $^{177}Lu$  izotópok komplexei), így a munkánk bár alap kutatás jellegű, de eredményei gyakorlati szempontból is érdekesek lehetnek. A gadolínium komplexek oldategyensúlyi, de főként disszociációjuk kinetikai vizsgálatának eredményei az utóbbi 3 – 4 évben különösen érdekesek lettek amióta ismertté vált egy újabb betegség, az ún. Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF), amit az MRI vizsgálatoknál kontrasztanyagként használt  $Gd^{3+}$  komplexekkel hoznak kapcsolatba. A súlyos vesebetegek  $Gd^{3+}$  tartalmú kontrasztanyaggal (főként  $Gd(DTPA-BMA)$ -val) végzett MRI vizsgálata után kisebb részük (közelítőleg 5%) állapota romlott, mozgásképtelenné váltak és többen elhunytak. Eddig kb. 250 NSF-es esetet írtak le. A betegek és elhunytak különböző szerveiben  $Gd$ -ot mutattak ki és feltételezik, hogy az a kontrasztanyag disszociációjából származik. A betegség pontos oka, kialakulása még nem ismert, de a különböző klinikai esetek ismertetése óta a  $Gd^{3+}$  komplexek fizikai-kémiai vizsgálata iránti érdeklődése jelentősen nőtt. Ezek az események az elmúlt 2 – 3 év során komolyan befolyásolták érdeklődésünket és igyekeztünk kísérleti munkánkat a fizioiógias feltételekhez közeli körülmények mellett végezni. Ennek következtében bár a pályázatban tervezett munkának szinte valamennyi részével foglalkoztunk, de a hangsúlyok az érdeklődés változásával módosultak. Így pl. a nemkovalens kölcsönhatások szerepének vizsgálatával kapcsolatban végzett munka a tervezettnél kisebb volumenű, amiben az is szerepet játszott, hogy a kapott eredmények nem voltak eléggé biztatóak. Ugyanakkor vizsgálatainkat kiterjesztettük a vérszérumban történő reakciók tanulmányozására, a szérum összetevőinek a  $Gd^{3+}$ -komplexek disszociációja sebességére gyakorolt hatásának, a szérumfehérjék szerepének a vizsgálatára. Ezen a területen érdekes (és váratlan) új

eredményeket értünk el, amelyek publikálásához még további 3-4 hónap kísérleti munka szükséges.

### 1. A nemkovalens kölcsönhatások szerepe a $Gd^{3+}$ komplexek viselkedésében

A különböző  $Gd^{3+}$  alapú MRI kontrasztanyagok és potenciális kontrasztanyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak megismeréséhez szükséges a  $Gd^{3+}$  komplexek és a biológiai körülmények mellett a  $Gd^{3+}$ -ionnal esetleg kompetícióba lépő  $Zn^{2+}$  és  $Cu^{2+}$  komplexek stabilitási állandóinak ( $\log K_{ML}$ ) a megállapítása. A stabilitási állandók meghatározása többnyire a koordinációs kémia igényeinek megfelelően 0,1 M  $Me_4NCl$  vagy  $KCl$  oldatban, állandó ionerősség mellett történt. A biológiai feltételekhez történő közelítés céljából a meghatározásokat a DTPA, a BOPTA és DTPA-BMA esetében elvégeztük fiziológiás, 0,15 M  $NaCl$  oldatban ( $25^\circ C$ ). A  $Gd^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  és  $Cu^{2+}$  komplexek  $\log K_{ML}$  értékei kb. 0,4 – 1,0  $\log K$  egységgel kisebbek, mint a  $KCl$ -dal vagy  $Me_4NCl$ -dal biztosított állandó ionerősség esetében.<sup>1</sup> Az azonos feltételek mellett kapott stabilitási állandókat használva a ligandumok gadoliniumra vonatkoztatott szelektivitása ( $\log K_{GdL} - \log K_{ML}$ ) mind a  $Zn^{2+}$ -, mind a  $Cu^{2+}$  - ionnal szemben a  $BOPTA > DTPA > DTPA-BMA$  sorrendben csökken<sup>1</sup>, ami épp ellentétes az irodalomban korábban közölt sorrenddel.<sup>2</sup>

A  $Gd^{3+}$  komplexek relaxivitása (a paramágneses fémkomplex koncentrációjának 1,0 mM-os növelésekor a vízprotonok relaxációsebességében mérhető növekedés,  $r_{1,2} = 1/T_{1,2}$ ) humán szérumalbumin (HSA) vagy bovine szérum albumin (BSA) jelenlétében nagyobb, mint 0,15 M  $NaCl$  oldatban. A relaxitás különbségek különösen nagyok a hidrofób benzil csoportot tartalmazó  $Gd(BOPTA)^{2-}$  vagy  $Gd(DTPA-bBzA)$  esetében. A relaxitás növekedésben szerepe lehet a  $Gd^{3+}$  komplexek és a HSA illetve BSA közötti elektrosztatikus és nemkovalens kölcsönhatásnak. A fehérjék protonálható amin nitrogénjei fiziológiás pH-n nagyrészt protonálva vannak. Az elektrosztatikus kölcsönhatás mértékének a vizsgálatára pH-potenciometriás titrálásokat végeztünk BSA-val  $Gd(DTPA)^{2-}$  illetve  $Gd(BOPTA)^{2-}$  jelenlétében és távollétében. A BSA titrálási görbéi (pH=4 – 9) a komplexek jelenlétében és távollétében teljesen azonosak, vagyis a BSA deprotonálódása azonos mértékű, tehát az elektrosztatikus kölcsönhatásnak nincs szerepe a fehérje –  $Gd^{3+}$  komplex kölcsönhatásban.

A nem-kovalens kölcsönhatás modellezésére a  $\beta$ -ciklodextrin és a benzilcsoportot tartalmazó komplexek között fellépő kölcsönhatást használtuk. A  $\beta$ -ciklodextrin henger alakú, hidrofób üreget tartalmazó molekula, melybe az ugyancsak hidrofób benzil csoport beléphet és a „gazda-vendég” kölcsönhatás révén egy adduktum képződik, melynek relaxivitása nagyobb, mivel az adduktum a komplexnél lassabban mozog és így nő a komplex u.n. rotációs korrelációs ideje.

A  $Gd^{3+}$  komplexek és a  $\beta$ -ciklodextrin közötti kölcsönhatás befolyásolja a komplexek stabilitási állandóját és kinetikai viselkedését is. A  $Gd(BOPTA)^{2-}$  stabilitási állandója kicsit nagyobb ötszörös  $\beta$ -ciklodextrin felesleg jelenlétében, míg a két benzil csoportot tartalmazó  $Gd(DTPA-bBzA)$  esetében a  $\log K_{GdL}$  érték növekedése 1,0  $\log K$  egység. A stabilitási állandók értékében  $\beta$ -ciklodextrin jelenlétében bekövetkező növekedés (amikor pl. a  $Gd(DTPA-bBzA)$  kb. 50%-a lép „gazda-vendég” kölcsönhatásba), tehát nem jelentős, vagyis a komplexek nem-kovalens kölcsönhatása lényegesen nem befolyásolja (kis mértékben növeli) a stabilitási állandók értékét.

A  $Gd(DTPA-bBzA)$  és a  $Cu^{2+}$ -citrát közötti fémcsere reakciók sebessége spektrofotometriás vizsgálataink szerint  $\beta$ -ciklodextrin jelenlétében kisebb, mint annak távollétében, de a hatás nem növeli jelentősen a  $Gd^{3+}$  komplex kinetikai inertségét.

## 2. A gadolinium komplexek és a trietilén-tetramin-hexaacetát közötti ligandumcsere reakciók kinetikája.<sup>5</sup>

A diagnosztikai vizsgálatokban MRI kontrasztanyagként használt  $Gd(DTPA)^{2-}$ ,  $Gd(BOPTA)^{2-}$  és  $Gd(DTPA-BMA)$  komplexeket (GdL) intravénásan juttatják a szervezetbe, melyek az extracelluláris térben eloszolva a vesén keresztül ürülnek kb. 1,5 órás felezési idővel (a  $Gd(BOPTA)^{2-}$  5%-a a májon keresztül ürül). Az alkalmazás feltétele, hogy a komplexek disszociációja annyira lassú legyen, hogy a kiürülés közben szabad  $Gd^{3+}$  ne keletkezzék. A komplexek kinetikai inertségét korábban a  $Zn^{2+}$  és  $Cu^{2+}$  ionokkal lejátszódó kicserélődési reakciók sebességével jellemeztük<sup>3,4</sup> (A  $Zn^{2+}$  és  $Cu^{2+}$  nagyon kis koncentrációban jelen van a testfolyadékokban). A  $Gd^{3+}$  komplexek disszociációja elvben a szervezetben található ligandumok hatására is bekövetkezhethet (fehérjék pl. transferrin), ezért modell reakcióként tanulmányoztuk a komplexek és a TTHA közötti ligandumcsere reakciók kinetikáját a pH=6,5 – 11 tartományban. A reakciók sebessége TTHA felesleg jelenlétében egyenesen arányos a TTHA teljes koncentrációjával, így a  $k_p$  pszeudo-első rendű sebességi állandók  $k_p = k_0 + k_1[TTHA]$  összefüggéssel adhatók meg. A GdL komplexek spontán disszociációja ( $k_0$ ) elhanyagolhatóan lassú. A  $k_p$  értékek és a  $[TTHA]$  közötti lineáris kapcsolat azt jelzi, hogy a reakciók a GdL komplexek és a TTHA közvetlen találkozásával, vegyes ligandumu közti termékek képződésén keresztül, az L ligandum donoratombjainak fokozatos kiszorításával játszódnak le. A  $Gd(DTPA)^{2-}$  és  $Gd(BOPTA)^{2-}$   $k_1$  értékei a pH függvényében minimum görbe szerint változnak, a minimum pH=8,5 körül van. A  $Gd(DTPA-BMA)$  ligandumcsere reakciói sebessége ( $k_1$ ) 2 - 3 nagyságrenddel nagyobb, mint a  $Gd(DTPA)^{2-}$  és  $Gd(BOPTA)^{2-}$

komplexeké és a pH növekedésével a  $k_1$  értékek fokozatosan nőnek. A pH növekedésével nő a kevésbé protonált  $H_1TTHA$  részecskék koncentrációja, melyek a GdL támadásában eredményesebbek. A  $Gd(DTPA)^{2-}$  és  $Gd(BOPTA)^{2-}$  reakciói esetében a  $k_1$  értékek pH=6,5 – 8,5 közötti csökkenését azzal magyaráztuk, hogy a reakció gyorsabban mehet végbe, ha a vegyesligandumú köztitermékben a támadó  $H_1TTHA$ -ról egy proton átkerül a koordinált DTPA vagy BOPTA ligandumra, vagyis érvényesül az általános savkatalízis.<sup>5</sup>

A  $H_1TTHA$  részecskék GdL komplexeken történő támadásának eredményessége a koordinált L ligandum intramolekuláris mozgásának sebességétől függ, ami szabad koordinációs helyek átmeneti megjelenését eredményezi. Az intramolekuláris átalakulás sebessége NMR vizsgálatok szerint gyorsabb a  $Ln(DTPA-BMA)$  komplexekben, mivel az amid O-Gd kötés gyengébb az acetát O-Gd kötésnél. A koordinált ligandumok intramolekuláris átalakulásainak sebessége NMR vizsgálataink szerint ligandum felesleg jelenlétében is nagyobb ( $La(DTPA-BMA) - DTPA-BMA$  és  $Eu(DTPA) - DTPA$  rendszerek), így várhatóan a TTHA jelenlétében is nagyobb. Az intramolekuláris átalakulások sebességének a DTPA-BMA komplexekben más ligandumok jelenlétében tapasztalt nagyobb mértékű növekedése eredményezi a  $Gd(DTPA-BMA)$  kisebb kinetikai inertségét.

A testfolyadékokban jelenlévő citrát, foszfát és karbonát ligandumok a GdL komplexek és a TTHA közötti ligandumcsere reakciók sebességének növekedését eredményezik. A hatás a  $Gd(DTPA-BMA)$  esetében a legnagyobb. Fiziológias feltételek mellett gyakorlatilag csak a karbonát ionok sebesség növelő hatása érvényesül, mivel a karbonát koncentráció aránylag nagy. Az NMR vizsgálataink szerint a citrát, foszfát és karbonát ionok ugyancsak megnövelik a koordinált L ligandumok intramolekuláris átalakulásának sebességét, ami a ligandumcsere reakciók sebességének növekedését eredményezi.

### 3. A $Gd(DTPA)^{2-}$ , $Gd(BOPTA)^{2-}$ és $Gd(DTPA-BMA)$ komplexek és a $Zn^{2+}$ és $Cu^{2+}$ közötti fémcsere reakciók kinetikája citrát, foszfát, karbonát és hisztidinát jelenlétében.

A  $Gd(DTPA)^{2-}$ ,  $Gd(BOPTA)^{2-}$  és  $Gd(DTPA-BMA)$  komplexek és a  $Zn^{2+}$ - valamint  $Cu^{2+}$ -ionok közötti fémioncsere reakciók 1,0 M KCl oldatban 4 – 6 pH tartományban döntően a fémionok közvetlen támadásával folynak le. A cserereakciók sebessége a három komplex esetében „tisztá”rendszerekben közelítőleg azonos.

Az endogén citrát, foszfát, karbonát és hisztidinát ionok jelenléte jelentősen módosítja a cserereakciók sebességét és lefolyását. A foszfát, karbonát és hisztidinát hatásának vizsgálatát citrát jelenlétében végeztük, mivel a  $Gd^{3+}$  - citrát aránylag nagy

stabilitása elősegítette a reakciók lefolyását és a  $Gd^{3+}$  oldatban tartását. A GdL és a  $Cu^{2+}$  komplexek közötti reakciókat spektrofotometriás, a  $Zn^{2+}$  komplexekkel végbemenő reakciókat relaxometriás módszerrel követtük. A részletes kinetikai vizsgálatok alapján megállapítottuk azokat a reakcióutakat, melyeken a fémioncsere reakciók lefolynak. A vizsgált (és a valódi biológiai) rendszerekben a szabad  $Zn^{2+}$  vagy  $Cu^{2+}$  ionok koncentrációja rendkívül kicsi, de a  $Cu^{2+}$ -hisztidinát, vagy  $Zn^{2+}$ -citrát komplexeknek sincs közvetlen szerepe a reakciók lefolyásában. A szabaddá váló DTPA, BOPTA vagy DTPA-BMA ligandumok a  $Cu^{2+}$  illetve  $Zn^{2+}$ -vel képeznek komplexet, míg a  $Gd^{3+}$   $Gd^{3+}$ -citrát formában van jelen.

A fémioncsere reakciók a GdL komplexek disszociációjával mennek végbe, melyben a spontán disszociációnak rendkívül kicsi, de a proton katalizált disszociációnak is kicsi a szerepe. Fiziológiai pH-n gyakorlatilag a hisztidinnek sincs hatása. Jelentékenyen növelik a GdL komplexek disszociáció sebességét a protonált  $HCit^-$ ,  $HCO_3^-$  és  $H_2PO_4^-$  ligandumok. Kisebb vagy elhanyagolható a disszociáció sebességet növelő hatása a deprotonált ligandumoknak ( $Cit^{3-}$ ,  $CO_3^{2-}$  és  $HPO_4^{2-}$ ). Ilyen tapasztalatok alapján azt kell feltételeznünk, hogy az endogén ligandumok hatása a képződő vegyes ligandum köztermékekben a koordinált L ligandumra történő protonátvitellel kapcsolatos.

Az endogén ligandumok jelenlétében a  $Gd(DTPA)^{2-}$  és  $Gd(BOPTA)^{2-}$  fémioncsere reakciói valamivel lassabban folynak le, mint az endogén ligandumok távollétében. Ugyanakkor a  $Gd(DTPA-BMA)$  komplex reakciói az endogén ligandumok hatására 1 – 2 nagyságrenddel nagyobb sebességgel mennek végbe, mint „tisztán” (1,0 M KCl) rendszerekben. Ezek az eredmények jelzik, hogy a  $Gd(DTPA-BMA)$  disszociációja biológiai rendszerekben is gyorsabban játszódik le, ami magyarázhatja, hogy az NSF gyakrabban fordul elő a  $Gd(DTPA-BMA)$  (Omniscan) kontrasztanyagként való alkalmazásakor.

#### 4. A BCAED és BCAEP ligandumok komplexképző sajátosságai<sup>6</sup>

A lantanida(III)-ionok többfunkciós, flexibilis ligandumokkal képződő komplexeinek stabilitási állandói a rendszám növekedésével általában nőnek. Két etiliminodiacetát csoportnak az 1,4-diazepán illetve, piperazin ciklusos diaminokhoz történő kapcsolásával előállított  $H_4BCAED$  és  $H_4BCAEP$  ligandum esetében a  $\log K_{LnL}$  értékek növekedése a  $La^{3+}$ -tól a  $Lu^{3+}$ -ig 8,22 és 5,66  $\log K$  egység. Így a BCAED ligandum az eddig ismert ligandumok közül a legnagyobb szelektivitást mutatja a nehéz lantanidákra. A relaxivitás mérések, de röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján is – a  $Gd(BCAED)^-$  illetve  $Gd(BCAEP)^-$  komplexek a belső koordinációs szférában nem tartalmaznak vízmolekulát, ami azt jelzi, hogy a ligandumok egy merev koordinációs „kalitkát” alakítanak ki, melyben a legkedvezőbb „méret

megfelelés” a  $\text{Lu}^{3+}$ -ion esetében jön létre. A  $\text{Lu}^{3+}$  komplexekben koordinált BCAED ligandum merev szerkezetét  $^{13}\text{C}$ - and  $^1\text{H}$ -NMR-es mérések is igazolták.

#### 5. A nyíltláncú EDTMP és makrociklusos DO2A2P ligandumok komplexképző sajátosságai

Az EDTA analóg, négy metilénfoszfónát csoportot tartalmazó EDTMP ligandum  $^{153}\text{Sm}$  és  $^{166}\text{Ho}$  radioaktív izotópokkal képződő komplexeit csontáttétes daganatos betegek fájdalmainak csökkentésére használják. A  $\text{Sm}(\text{EDTMP})^{5-}$  és  $\text{Ho}(\text{EDTMP})^{5-}$  komplexek stabilitási állandóira az irodalomban rendkívül eltérő értékeket közöltek. pH-potenciometriás módszerrel meghatároztuk a  $\text{Cu}(\text{EDTMP})^{6-}$  és  $\text{Ca}(\text{EDTMP})^{6-}$  komplexek stabilitási állandóit, majd  $\text{Cu}^{2+}$ -ionokkal kompetíciós reakcióban spektrofotometriás módszerrel a  $\text{Sm}(\text{EDTMP})^{5-}$  és  $\text{Ho}(\text{EDTMP})^{5-}$   $\log K_{LnL}$  értékeit. Stopped-flow módszerrel vizsgáltuk a  $\text{Sm}(\text{EDTMP})^{5-}$  és  $\text{Ho}(\text{EDTMP})^{5-}$  komplexek és a  $\text{Cu}^{2+}$ -citrát közötti fémcsere reakciók kinetikáját a pH 7 – 9 tartományban. A cserereakciók a komplexek protonkatalizált disszociációját követően aránylag gyorsan folynak le (a protonált komplexek nagy koncentrációban vannak jelen), így a csontokba valószínűleg nem az intakt komplexek, hanem a disszociált szabad ligandum és a fémionok épülnek be.<sup>7</sup>

Tanulmányoztuk a ciklén alapú két – két transz-helyzetű acetát és metilénfoszfónát funkciós csoportot tartalmazó  $\text{H}_6\text{DO2A2P}$  ligandum komplexképző sajátosságait. A  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás titrálással, míg a  $\text{Ln}^{3+}$ -komplexekét a lassú képződés miatt külön-mintás pH-potenciometriás módon határoztuk meg. A  $\text{Ln}(\text{DO2A2P})^{3-}$  komplexek stabilitási állandói nagyobbak a DOTA, de kisebbek a DOTP komplexekénél. Relaxometriás és  $^{17}\text{O}$ -NMR-es vizsgálataink szerint a  $\text{Gd}(\text{DO2A2P})^{3-}$  belső koordinációs szférájában nincs vízmolekula. A  $\text{Ln}^{3+}$ -komplexek képződése lassú és egy kétszerprotonált stabilis köztitermék képződésével, annak  $\text{OH}^-$ -katalizált átalakulásával, illetve spontán módon, egy protonnak a nitrogén atomról egy foszfónát csoportra történő átvitelével mehet végbe. A komplexképződés sebességének sorrendje  $\text{DOTA} > \text{DO2A2P} > \text{DOTP}$ . A  $\text{Ln}^{3+}$ -komplexek protonkatalizált disszociációjának sorrendje fordított:  $\text{DOTP} > \text{DO2A2P} > \text{DOTA}$ .  $^{13}\text{C}$ - és  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópiával az  $\text{Eu}(\text{DO2A2P})$  esetében egy négyzetes antiprizmás és egy torzult-négyzetes antiprizmás izomer jelenlétét mutattuk ki. Az izomerek átalakulásának aktiválási energiája kisebb, mint az  $\text{Eu}(\text{DOTP})$  esetében.<sup>8</sup>

## Irodalomjegyzék

- <sup>1</sup> Zs. Baranyai, Z. Pálinkás, F. Uggeri, E. Brücher; *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, 1948–1956.
- <sup>2</sup> W. P. Cacheris, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Magn. Reson. Imaging*, **1990**, 8, 467.
- <sup>3</sup> L. Sarka, L. Burai, E. Brücher, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 719.
- <sup>4</sup> L. Sarka, L. Burai, R. Király, L. Zékány, E. Brücher, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 21, 320.
- <sup>5</sup> Z. Pálinkás, Zs. Baranyai, E. Brücher, B. Rózsa, *Inorg. Chem.*, (közlésre beküldve, kisebb módosításokat javasoló bírálatok után)
- <sup>6</sup> L. Tei, Zs. Baranyai, E. Brücher, C. Cassino, F. Demicheli, N. Masciocchi, G. B. Giovenzana, M. Botta; *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 616–625.
- <sup>7</sup> F. K. Kálmán, R. Király, E. Brücher, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 4719 – 4727.
- <sup>8</sup> F. K. Kálmán, Zs. Baranyai, I. Tóth, I. Bánya, R. Király, E. Brücher, S. Aime, X. Sun, A.D. Sherry, Z. Kovács; *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 3851–3862.

A ligandumok szerkezeti képletei:

